

**VORSTUFEN-POLYPEPTIDE DER
CYTOCHROMOXIDASE VON
NEUROSPORA CRASSA**

Andreas J. Schwab

1973





Digitized by the Internet Archive
in 2026

VORSTUFEN-POLYPEPTIDE DER CYTOCHROMOXIDASE

VON NEUROSPORA CRASSA

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Andreas J. Schwab

aus Athen

München 1972

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Feodor Lynen
Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1973



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. FRAGESTELLUNG	1
2. PLAN	4
3. ERGEBNISSE	
3.1. Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin in die Proteine in Gegenwart und in Abwesen- heit von Cycloheximid	
3.1.1. Zugabe von Leucin in niedriger Konzentration	6
3.1.2. Zugabe von Leucin in höherer Konzentration	15
3.2. Bestimmung der Proteinsynthese-Geschwindigkeit aus der Wachstumsgeschwindigkeit	19
3.3. Einfluß von Cycloheximid auf den Aminosäure- Pool von Neurospora	21
3.4. Bestimmung des Protein-Abbaus	24
3.5. Kinetik der Markierung der Cytochromoxidase in Abwesenheit von Cycloheximid	24
3.6. Nachweis der Beteiligung verschiedener Vor- stufen-Pools bei der Biogenese der Cytochrom- oxidase	
3.6.1. Kinetik des Erscheinens markierter Poly- peptide in der Cytochromoxidase	28
3.6.2. Halbwertszeiten der Vorstufen-Pools der Cytochromoxidase	32
3.6.3. Poolgrößen der Vorstufen der Cytochrom- oxidase	35

4. DISKUSSION	
4.1. Anteil des in den Mitochondrien synthetisierten mitochondrialen Membranproteins	36
4.2. Mechanismus der Biosynthese der Cytochromoxidase	41
5. EXPERIMENTELLER TEIL	
5.1. Anzucht und Markierung der Mycelien	44
5.2. Bestimmung der Radioaktivität im Aminosäurepool und im Gesamtprotein	45
5.3. Ermittlung der Verwertbarkeit von Aminosäuren als alleinige Kohlenstoffquelle	46
5.4. Dünnschichtchromatographie der intracellulären Aminosäuren	46
5.5. Isolierung von mitochondrialen Membranen und von löslichen Proteinen des Cytosols	47
5.6. Isolierung der Cytochromoxidase	48
5.7. Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese	51
6. ZUSAMMENFASSUNG	54
7. LITERATURVERZEICHNIS	56
LEBENS LAUF	59

1. FRAGESTELLUNG

Die Proteine der Mitochondrien werden an zwei verschiedenen Stellen in der Zelle synthetisiert, an den Ribosomen des Cytoplasmas und an den Ribosomen der Mitochondrien. Vermutlich ist die Information zu den an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Proteinen auch auf der mitochondrialen DNA codiert. An der Biogenese der Mitochondrien sind also zwei Systeme beteiligt, ein internes und ein externes (siehe die Übersichtsartikel von Ashwell, 1970, Beattie, 1971 und Borst, 1972).

Den quantitativen und qualitativen Beitrag dieser beiden Systeme kann man mit Hilfe von Markierungsexperimenten nach spezifischer Ausschaltung eines der beiden Systeme ermitteln. Hemmt man das cytoplasmatische System mit Cycloheximid, oder arbeitet man mit isolierten Mitochondrien, so wird ein kleiner Teil der Proteine der mitochondrialen Innenmembran markiert und ist somit mitochondrialen Ursprungs. Der größte Teil der Proteine der mitochondrialen Innenmembran sowie die Proteine der Außenmembran und der Matrix werden unter diesen Bedingungen nicht markiert. Daraus kann man folgern, daß diese Proteine an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert werden (Neupert, 1967 und 1971; Beattie, 1967).

Die vom Cycloheximid-resistenten System synthetisierten Polypeptide werden in funktionelle Membranproteine integriert, so z. B. in die Cytochromoxidase, das Cytochrom b und die Oligomycin-hemmbar ATPase (Weiß, 1971 und 1972; Tzagoloff, 1972). Die Cytochromoxidase ist aus sechs Polypeptiden aufgebaut, von denen nur eines in Gegenwart von Cycloheximid markiert wird (Weiß, 1971). Das weist darauf hin, daß dieses Enzymprotein bei seiner Entstehung aus Teilen zusammengefügt wird, die an zwei Stellen in der Zelle synthetisiert werden. Ähnliches gilt auch für das Cytochrom b (Weiß, 1972) und für die ATPase (Tzagoloff, 1972). Die Kooperation zwischen externem und internem System erfolgt also auch auf der Stufe einzelner Membranproteine.

Der Zusammenbau eines solchen zusammengesetzten Membranproteins müßte verhindert werden, wenn ein Teil seiner Bausteine durch die Hemmung eines der beiden Proteinsynthesesysteme nicht mehr nachgeliefert wird. Daß unter den Bedingungen der Cycloheximid-Hemmung trotzdem ein Einbau von Radioaktivität in die Cytochromoxidase beobachtet werden kann, kann auf zweierlei Weise erklärt werden: Entweder sind Polypeptidketten (Untereinheiten) in vivo zwischen den einzelnen Enzymmolekülen austauschbar, oder aber es bestehen Pools an Vorstufen-Polypeptiden, die ein Weiterlaufen des Zusammenbaus des Enzymproteins für eine beschränkte Zeit ermöglichen.

Ein besseres Verständnis des Prozesses des Zusammenbaus dieser Membranproteine erfordert eine kinetische Analyse der Markierung der mitochondrialen Proteine mit radioaktiven Aminosäuren. Eine solche Analyse erlaubt zusätzlich eine quantitative Erfassung des Anteils der an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Proteine am gesamten mitochondrialen Membranprotein. In vorliegender Arbeit werden solche Markierungsexperimente an *Neurospora crassa* beschrieben. Dieser Mikroorganismus bietet folgende Vorteile:

1. Jede Kultur besteht aus lauter gleichartigen Zellen.
2. Durch das schnelle Wachstum der Kulturen ist ein hoher Einbau an radioaktiven Aminosäuren möglich.
3. Unter den Bedingungen exponentiellen Wachstums läßt sich der Massenzuwachs und damit die Synthesegeschwindigkeit jedes Proteins aus der Wachstumsgeschwindigkeit der ganzen Kultur ermitteln.

Aus früheren Experimenten mit diesem Organismus ist gefolgert worden, daß eine dem Kulturmedium wachsender Zellen zugesetzte radioaktive Aminosäure zunächst in den intrazellulären Aminosäure-Pool aufgenommen und anschließend in die Proteine eingebaut wird (Zalokar, 1961). Die in der Literatur beschriebenen Markierungsexperimente, die die Untersuchung der Biogenese der Mitochondrien zum Ziel haben, berücksichtigen jedoch nicht die Rolle von Vorstufen-Pools bei der Markierung der Proteine.

2. PLAN

Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

1. Nach Zugabe von radioaktivem Leucin in eine wachsende Neurospora-Kultur wurde das Auftreten der Radioaktivität in folgenden Fraktionen zeitlich verfolgt:
 - a) im Kulturmedium,
 - b) im freien intracellulären Leucin-Pool,
 - c) im Gesamtprotein der Zelle,
 - d) im mitochondrialen Membranprotein als ganzes und zum Vergleich in den löslichen Proteinen des Cytoplasmas,
 - e) in der Cytochromoxidase als ganzes und in ihren einzelnen Polypeptiden. Die Cytochromoxidase wurde durch Chromatographie von mitochondrialen Membranen an einem lipophilen Ionenaustauscher (Weiß, 1970a) gewonnen. Dieses Verfahren erlaubt ein Arbeiten mit kleinen Mengen, für Markierungsversuche eine wesentliche Voraussetzung.
2. Die Geschwindigkeit der Proteinsynthese wurde zusätzlich aus der Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur abgeleitet.
3. Zur Absicherung und als Grundlage der Auswertung wurde noch berücksichtigt:

- a) inwieweit ein Abbau von Proteinen erfolgt. Ein derartiger Abbau würde die Markierungskinetik der Proteine beeinflussen und außerdem eine Re-utilisation von radioaktivem Leucin ermöglichen;
- b) der Einfluß der Leucin-Konzentration auf die Markierungskinetik;
- c) der Einfluß von Cycloheximid auf den Aminosäure-Pool und auf die Kinetik der Markierung des Leucin-Pools und der Proteine;
- d) ob als Nebenweg zum Einbau von freiem intracellulärem Leucin in die Proteine auch ein nennenswerter Abbau von Leucin erfolgt.

Durch eine quantitative Auswertung der Markierungskinetik des mitochondrialen Membranproteins in Gegenwart und in Abwesenheit von Cycloheximid konnte der quantitative Anteil des an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Proteins am gesamten mitochondrialen Membranprotein abgeschätzt werden. Aus dem verspäteten Auftreten der Radioaktivität in der Cytochromoxidase konnte auf die Beteiligung von Vorstufen-Pools bei der Biogenese dieses Enzymproteins geschlossen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Kinetik des Einbaus von radioaktivem Leucin in die Proteine in Gegenwart und in Abwesenheit von Cycloheximid

3.1.1. Zugabe von Leucin in niedriger Konzentration

Eine exponentiell wachsende Neurospora-Kultur wurde in 50-ml-Portionen geteilt. In jeder Portion wurden die Proteine zunächst durch Zugabe von $0,1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-Leucin}$ (250 mCi/mmol) markiert. Folgende spezifischen $^3\text{H-Radioaktivitäten}$ wurden nach 30 min (vgl. weiter unten) erzielt: Im Gesamtprotein $21,9 \pm 1,7 \text{ Imp/min}/\mu\text{g Protein}$, in den Mitochondrienmembranen $26,6 \pm 1,8 \text{ Imp/min}/\mu\text{g Protein}$, in den löslichen Proteinen des Cytosols $20,6 \pm 2,0 \text{ Imp/min}/\mu\text{g Protein}$ (Die Fehlergrenzen sind Standardabweichungen).

Die Massen aller Zellbestandteile nehmen in einer exponentiell wachsenden Kultur proportional zu. Die $^3\text{H-Markierung}$ wird sich folglich nach einiger Zeit gleichmäßig über alle Proteine verteilen, sofern diese keinen wesentlichen Turnover aufweisen. Sie kann also in diesem Fall als Indikator für Protein benutzt werden (Grundmarkierung).

Für die Meßpunkte ohne Cycloheximid wurde 30 min, 5 min, 2 min, 1,5 min, 1 min und 0,5 min vor dem Ende des 30-

minütigen Einbaus von ^3H -Leucin ^{14}C -Leucin dem Kulturmedium zugegeben. Die eingesetzte Leucinmenge (0,19 $\mu\text{mol/g}$ Protein) kann den intracellulären Pool an freiem Leucin (4 $\mu\text{mol/g}$ Protein, siehe Abb. 1 B) um höchstens 5% vergrößern, was zu vernachlässigen ist. Die Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität auf das Kulturmedium, den untracellulären freien Leucin-Pool und das Gesamtprotein, repräsentiert durch die in Trichloroessigsäure unlösliche Radioaktivität, ist in Abb. 1 A dargestellt.

Die ^{14}C -Radioaktivität im Medium nimmt annähernd exponentiell mit der Zeit ab. Dieses Verhalten entspricht einer Aufnahme der Aminosäure durch die Zellen nach einer Kinetik erster Ordnung. Die verwendete Leucin-Konzentration (0,16 μM) liegt unterhalb der Michaelis-Konstanten für die beiden Leucin-Aufnahmesysteme von *Neurospora* (4 μM und 120 μM , Pall, 1969).

Die Zellen nehmen die radioaktive Aminosäure innerhalb von 2 min zu 95% auf. Die ^{14}C -Radioaktivität im freien Leucin-Pool steigt zunächst an und fällt dann wieder auf einen vernachlässigbaren Wert ab (2% der zugegebenen Gesamtmenge), wobei die absolute Größe des Leucin-Pools ungefähr konstant bleibt (Abb. 1 B). Die Proteine werden nach einer kurzen Lag-Phase von 0,5 min schnell markiert; nach 5 min enthalten sie 85 % der Gesamtradioaktivität.

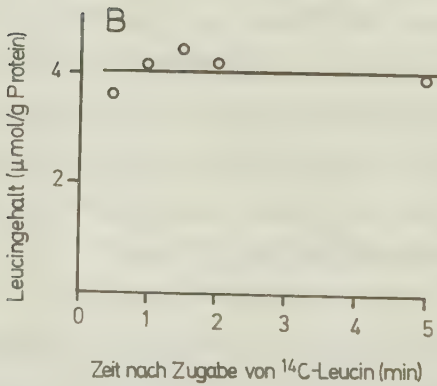
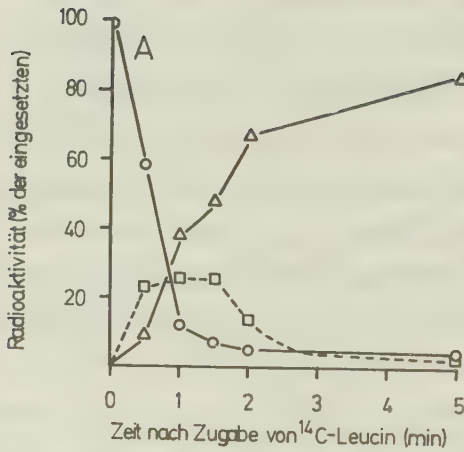


Abb. 1. Pulsmarkierung der Zellproteine durch Zusatz von ^{14}C -Leucin in kleiner Konzentration ($2,5 \mu\text{Ci je } 50\text{-ml-Kultur}$, 330 mCi/mmol) zum Kulturmedium. A: Zeitverlauf der Radioaktivität im Kulturmedium (o—o), im intracellulären freien Leucin-Pool (□---□) und im Gesamtprotein (Trichloressigsäure-unlösliche Radioaktivität) (Δ—Δ). B: Zeitverlauf der absoluten Größe des Leucin-Pools.

Aus diesem Verlauf kann man schließen, daß das externe Leucin zunächst in den intracellulären Pool aufgenommen wird; von dem aus die Proteinsynthese erfolgt. Das radioaktive Leucin wird dabei fortwährend durch nicht radioaktives Leucin ersetzt, das durch die Zelle neu synthetisiert wird. Die gesamte Radioaktivität wird binnen weniger Minuten eingebaut, so daß eine Pulsmarkierung von Polypeptiden die Folge ist.

In Abb. 2 ist der Zeitverlauf des Einbaus von ^{14}C -Leucin in Gegenwart von Cycloheximid dargestellt. ^3H -Leucin (als Grundmarkierung) wurde 30 min vor und ^{14}C -Leucin 2 min nach der Zugabe des Inhibitors zugegeben.

Nach einer schnellen weitgehenden Aufnahme des ^{14}C -Leucins durch die Zellen kehrt ein kleiner Teil der Radioaktivität in das Kulturmedium zurück. In Übereinstimmung damit nimmt sowohl die absolute als auch die spezifische (Abb. 2 B) Radioaktivität im freien Leucin-Pool anfangs schnell zu und fällt dann allmählich wieder ab. Der Einbau der Radioaktivität ins Gesamtprotein ist wesentlich langsamer und dauert über längere Zeit an als in der Kontrolle ohne Inhibitor. Eine Pulsmarkierung von Polypeptiden ist in Gegenwart von Cycloheximid nicht möglich.

Die absolute Größe des Leucinpools ist in Gegenwart von Cycloheximid erhöht, bleibt aber im hier betrachteten

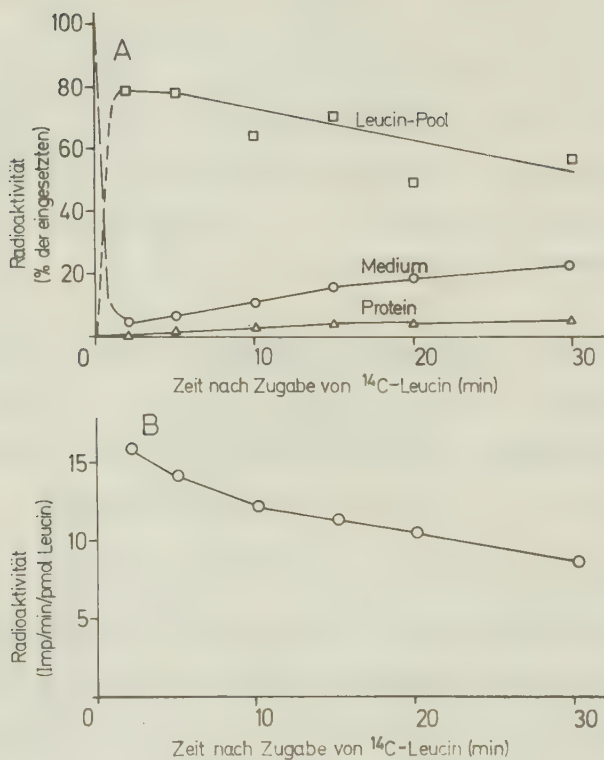


Abb. 2. Markierung der Zellproteine durch Zusatz von ^{14}C -Leucin in kleiner Konzentration ($5 \mu\text{Ci}$ je 50-ml-Kultur, 330 mCi/mmol) zum Kulturmedium in Gegenwart von Cycloheximid. Der Hemmstoff wurde 2 min vor Zusatz des ^{14}C -Leucins zugegeben. A: Zeitverlauf der Radioaktivität des Kulturmediums (o—o), des intracellulären freien Leucin-Pools (□—□) und des Gesamtproteins (Δ—Δ). B: Zeitverlauf der spezifischen Radioaktivität des Leucin-Pools.

Zeitraum konstant (vgl. Abb. 8, S.22). Die Abnahme der Radioaktivität im Leucin-Pool läßt sich ausreichend durch den Rückfluß in das Medium und den Einbau in die Proteine erklären. Das Leucin wird also nicht in nennenswertem Maße abgebaut. In Übereinstimmung damit kann Leucin, ebenso wie alle anderen Protein-Aminosäuren mit Ausnahme von Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure (Glutamin und Asparagin wurden nicht getestet) nicht als alleinige Kohlenstoffquelle an Stelle von Saccharose das Wachstum von Neurospora-Zellen unterhalten. Vermutlich sind die entsprechenden Stoffwechselwege bei diesem Organismus nicht angelegt.

Abb. 3 zeigt den Einbau von ^{14}C -Leucin in verschiedene Zellfraktionen in Gegenwart und in Abwesenheit von Cycloheximid. Die dargestellten spezifischen ^{14}C -Radioaktivitäten wurden aus den $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnissen durch Multiplikation mit der mittleren spezifischen ^3H -Radioaktivität der entsprechenden Fraktion erhalten. Auf diese Weise wurde die Ungenauigkeit der Proteinbestimmung eliminiert.

In Abwesenheit des Inhibitors läuft der Einbau der radioaktiven Aminosäuren in die Mitochondrienmembranen und in die löslichen Proteine des Cytosols parallel mit dem in das Gesamtprotein. Bemerkenswert ist, daß zwischen der Markierung der mitochondrialen Proteine und

der des Gesamtproteins kein meßbarer Zeitunterschied besteht. Der Transport der an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisierten Proteine vom Ort ihrer Synthese bis in die Mitochondrienmembran muß also sehr schnell erfolgen.

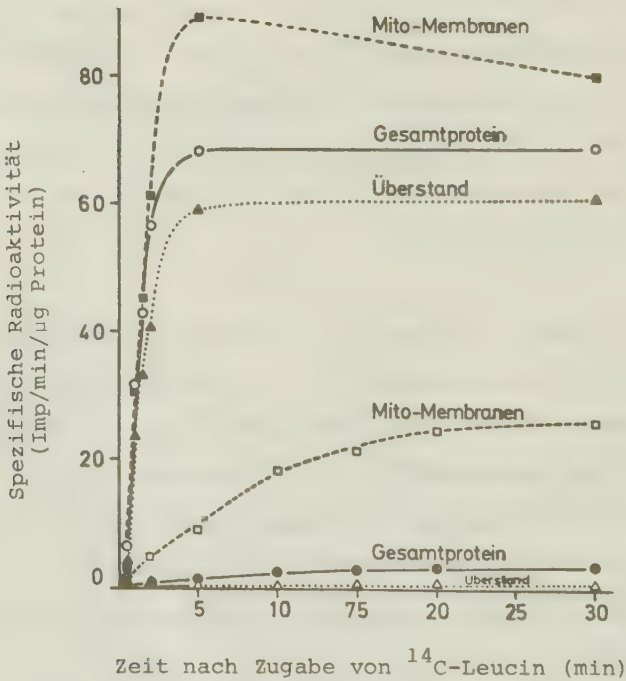


Abb. 3. Einbau von ¹⁴C-Leucin in das Gesamtprotein, die mitochondrialen Membranproteine und die löslichen Proteine des Cytosols (100 000 × g-Überstands) in Gegenwart (untere drei Kurven) und in Abwesenheit (obere drei Kurven) von Cycloheximid. Markierungsbedingungen siehe Abb. 1 und 2. Die Werte beziehen sich einheitlich auf eine Zugabe von 2,5 µCi ¹⁴C-Leucin je 50-ml-Kultur.

In Gegenwart von Cycloheximid übersteigt der Einbau der Radioaktivität in die löslichen Proteine des Cytosols nicht 1 % desjenigen in Abwesenheit des Hemmstoffs. Dieser geringe Einbau wird wahrscheinlich hauptsächlich durch eine kleine Menge nicht sedimentierter Mitochondrienmembran-Fragmente verursacht (Hawley, 1969).

Der Einbau von radioaktivem Leucin in die Mitochondrienmembran zeigt den gleichen zeitlichen Verlauf wie der in das Gesamtprotein, er ist jedoch im Vergleich dazu um den Faktor 7 höher. Das steht im Einklang mit der Tatsache, daß das mitochondriale Membranprotein etwa $1/7$ des Gesamtproteins ausmacht (vgl. Weiß, 1969), so daß die Radioaktivität in den Mitochondrienmembranen gegenüber der im Gesamtprotein um den Faktor 7 angereichert wird.

Aus der Geschwindigkeit des Einbaus von radioaktivem Leucin in die Proteine läßt sich durch Division durch die spezifische Radioaktivität des freien intracellulären Leucins die Geschwindigkeit ermitteln, mit der das Leucin in das Protein der entsprechenden Fraktion eingebaut wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Im Fall ohne Cycloheximid wurden die Meßwerte zwischen 0,5 min und 1,5 min nach Zugabe von ^{14}C -Leucin ausgewertet. Da im Falle mit Cycloheximid die Leucin-Einbaugeschwindigkeit mit der Zeit abnimmt

(Abb. 4), wurden in Tabelle 1 auf den Zeitpunkt der Zugabe von Cycloheximid extrapolierte Werte aufgenommen.

Tabelle 1. Geschwindigkeit des Lecin-Einbaus in die Proteine wachsender Neurospora-Zellen in Gegenwart und in Abwesenheit von Cycloheximid (Alle Werte in $\mu\text{mol/g Protein/min}$).

		Markierung bei hoher Leucinkon- zentration	Markierung bei niedr. Leucinkon- zentration	Aus der Wachs- tumsgeschwind. ermittelter Wert
ohne Cycloheximid	Gesamt- protein	2,4	5,4	
	mitoch. Membran- protein	2,6	5,9	2,45
	lösliche cytosol. Proteine	1,5	5,7	
mit Cycloheximid	Gesamt- protein	0,02	0,03	
	mitoch. Membran- protein	0,28	0,23	
	lösliche cytosol. Proteine	0,00	0,00	
% Cycloheximid- resistenter Einbau	Gesamt- protein	0,8	1,8	
	mitoch. Membran- protein	11	4	
	lösliche cytosol. Proteine	0	0	

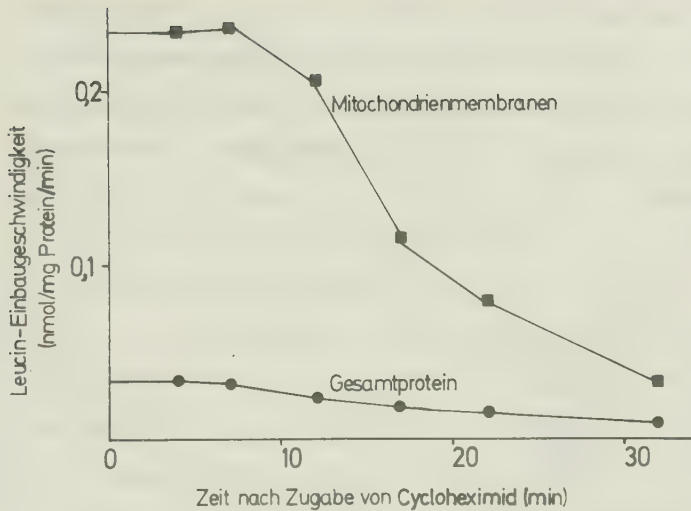


Abb. 4. Zeitverlauf der Einbaugeschwindigkeit von Leucin in das Gesamtprotein und in das mitochondriale Membranprotein in Gegenwart von Cycloheximid. Die Werte wurden aus den in Abb. 3 dargestellten Meßergebnissen berechnet.

3.1.2. Zugabe von Leucin in höherer Konzentration

Alle Proteine wurden zunächst gleichmäßig mit ^3H -Leucin gleichmäßig markiert ($0,5 \mu\text{Ci}/50\text{-ml-Kultur}$, $250 \text{ mCi}/\text{mmol}$) (Grundmarkierung). Die nach 30 min erzielten spezifischen Radioaktivitäten waren $3,2 \pm 0,3 \text{ Imp/min}/\mu\text{g Protein}$ für das Gesamtprotein, $4,8 \pm 0,6 \text{ Imp/min}/\mu\text{g Protein}$ für die mitochondrialen Membranen und $3,9 \pm 0,2 \text{ Imp/min}/\mu\text{g Protein}$ für die löslichen

Proteine des Cytosols. 20 min, 15 min, 10 min, 5 min und 2 min vor Beendigung der ^3H -Markierungszeit bzw. 2 min nach Zugabe von Cycloheximid wurde ^{14}C -Leucin in einer Konzentration von 0,2 mM zugegeben (250 $\mu\text{mol/g}$ Protein).

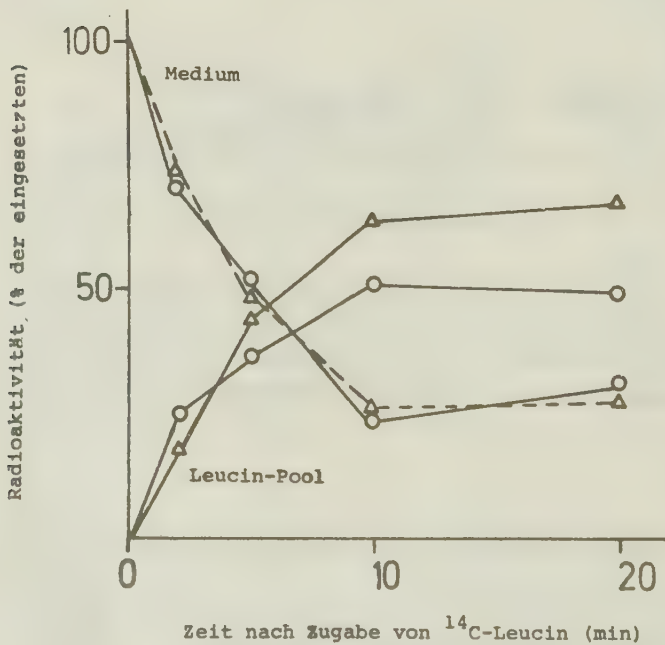


Abb. 5. Zeitverlauf der Aufnahme von in höherer Konzentration (0,2 mM) angebotenen ^{14}C -Leucin (2,5 bis 40 μCi je 50-ml-Kultur) durch wachsende Neurospora-Zellen in Gegenwart (o—o) und in Abwesenheit (Δ — Δ) von Cycloheximid. Mit "Leucin-Pool" ist die trichloressigsäure-lösliche Radioaktivität bezeichnet.

Die Aminosäure wird auch in dieser höheren Konzentration noch schnell aufgenommen (Abb. 5). Nach 10 min enthalten die Zellen 50 - 60 % der eingesetzten ^{14}C -Radioaktivität. Diese Menge entspricht dem 30fachen des ursprünglich vorhandenen freien Leucin-Pools (4 $\mu\text{mol/g}$ Protein). Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Trichloressigsäure-Extrakte ergab zwei radioaktive Flecken. Der eine, der die Hauptmenge der aufgetragenen ^{14}C -Radioaktivität enthielt, ließ sich auf Grund des R_f -Wertes mit Leucin identifizieren. Der zweite Fleck, der 20 - 30 % der aufgetragenen ^{14}C -Radioaktivität enthielt, trat nicht auf, wenn ein gereinigtes Aminosäuregemisch aufgetragen wurde, das aus dem Trichloressigsäure-Extrakt durch Chromatographie an einem Kationenaustauscher gewonnen wurde. Wahrscheinlich stellt dieser Flecken 2-Keto-isocapronsäure dar, die in vivo mit Leucin im Gleichgewicht steht und somit auch einen Bestandteil des Leucin-Pools darstellt. Der Leucin-Pool wird also durch das zugesetzte Leucin auf mindestens das 20fache, unter Hinzurechnung der 2-Keto-isocapronsäure auf das 30fache vergrößert. Unter diesen Bedingungen ist die Neusynthese von Leucin allosterisch gehemmt (Webster, 1965), die ^{14}C -Radioaktivität wird also nicht mehr auf diesem Weg verdünnt. Die ^{14}C -Radioaktivität im Pool wird somit nach einigen Minuten konstant und gleich der des eingesetzten Leucins sein. Die in die Proteine eingebaute Leucinmenge kann man folglich aus den gemessenen spezifischen ^{14}C -

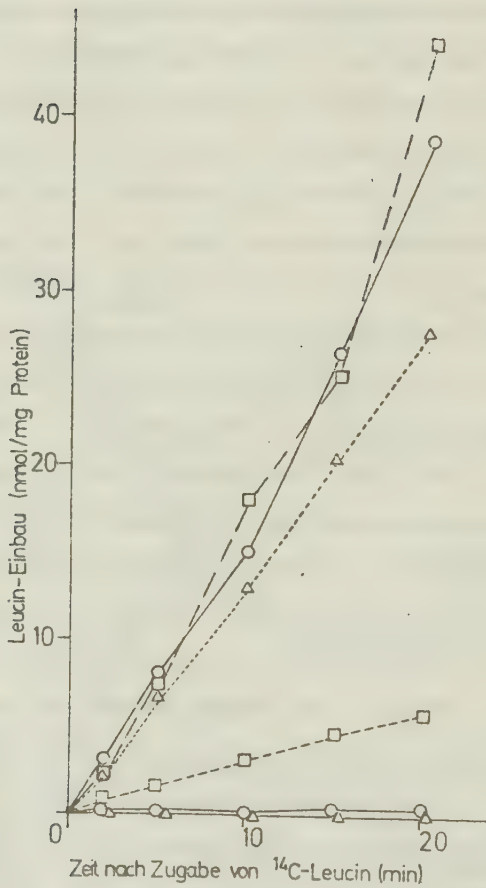


Abb. 6 Zeitverlauf des Einbaus von in höherer Konzentration (0,2 mM) angebotenem ¹⁴C-Leucin in das Gesamtprotein (o—o), das mitochondriale Membranprotein (□---□) und die löslichen Proteine des Cytosols (Δ...Δ) in Gegenwart (untere drei Kurven) und in Abwesenheit (obere drei Kurven) von Cycloheximid. Markierungsbedingungen siehe Abb. 5.

Radioaktivitäten der Proteine durch Division durch die spezifische ^{14}C -Radioaktivität des eingesetzten Leucins direkt berechnen.

In Abb. 6 ist der auf diese Weise ermittelte Zeitverlauf des Leucin-Einbaus in verschiedene Proteinfractionen dargestellt; die spezifischen ^{14}C -Radioaktivitäten der Proteine wurden auch in diesem Fall aus den $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnissen durch Division durch die mittlere spezifische ^3H -Radioaktivität der betreffenden Proteinfraction ermittelt. Der Leucin-Einbau in die untersuchten Fraktionen ist 20 min lang annähernd linear. In Tabelle 1 (Seite 14) sind die aus den Werten zwischen 10 und 20 min ermittelten Einbaugeschwindigkeiten von Leucin in die verschiedenen Proteine aufgenommen. Ähnlich wie bei niedrigen Leucinkonzentrationen ist der Einbau in Gegenwart von Cycloheximid in die mitochondrialen Membranen um den Faktor 10 schneller als der in das Gesamtprotein.

3.2. Bestimmung der Proteinsynthese-Geschwindigkeit aus der Wachstumsgeschwindigkeit

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Neurospora-Zellen unter den hier vorliegenden Bedingungen wurde durch Bestimmung des Trockengewichtes ermittelt. In Abb. 7 sind die Trockengewichte von 50-ml-Portionen logarithmisch gegen die

Zeit der Entnahme aus einer wachsenden Kultur aufgetragen. Es ergibt sich eine Verdopplungszeit der Kultur von 200 min. Unter den Bedingungen des exponentiellen Wachstums verdoppeln sich die Proteine in der gleichen Zeit. Vernachlässigt man den Protein-Turnover, so entspricht der Massenzuwachs der Proteine der Proteinsynthese-Geschwindigkeit. Bei einem Leucingehalt des Gesamtproteins von 8 % errechnet sich daraus eine Leucin-Einbaugeschwindigkeit von $2,45 \mu\text{mol/g Protein/min}$.

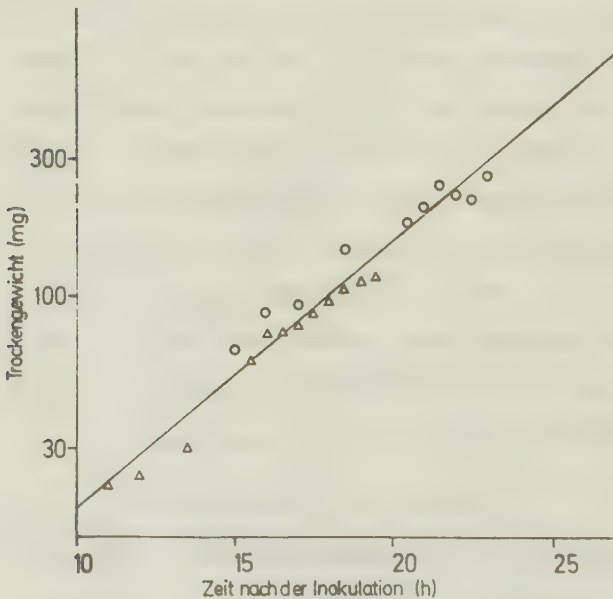


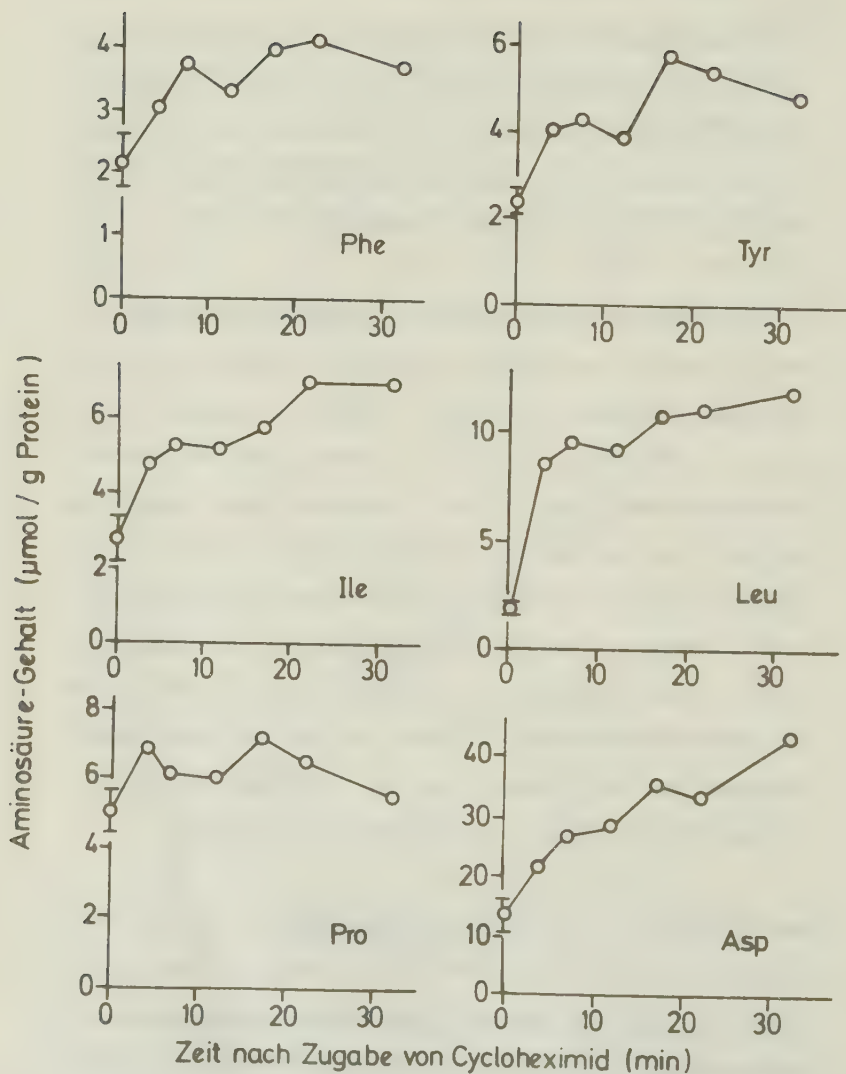
Abb. 7. Wachstumskurve von exponentiell wachsenden *Neurospora*-Zellen. Die Trockengewichte von 50-ml-Portionen sind logarithmisch gegen die Zeit ihrer Entnahme aus einer wachsenden Kultur aufgetragen.

3.3. Einfluß von Cycloheximid auf den Aminosäure-Pool von Neurospora

Da in Gegenwart von Cycloheximid der größte Teil der Proteinsynthese gehemmt wird, werden sich die Aminosäuren im intracellulären Pool akkumulieren. In Abb. 8 ist der Einfluß von Cycloheximid auf den Pool von zehn verschiedenen Aminosäuren dargestellt.

In allen Fällen ist ein Anstieg des Aminosäuregehaltes der Zellen durch den Einfluß des Hemmstoffs zu beobachten. Im Falle von Leucin nimmt der Gehalt zunächst rasch zu und erreicht nach ca. 5 min einen annähernd konstanten Wert von 10 $\mu\text{mol/g}$ Protein. Wenn man annimmt, daß der intracelluläre Lösungsraum 0,5 ml/g Feuchtwicht und der Proteingehalt der Zellen 40 mg/g Feuchtwicht beträgt, entspricht der Endwert des Leucingehaltes einer intracellulären Konzentration von 0,8 mM. Bei dieser Konzentration kommt die Leucin-Biosynthese offenbar zum Stillstand, was auf eine Regulation des intracellulären Leucin-Pools schließen läßt.

Nach Webster (1965) hemmt Leucin allosterisch das erste Enzym in seinem Syntheseweg, die 2-Isopropylmalat-synthetase. In vitro bei pH 7 ist die Hemmung bei einer Leucinkonzentration von ca. 1 mM vollständig, was mit dem hier gezeigten Ergebnis in vivo gut übereinstimmt.



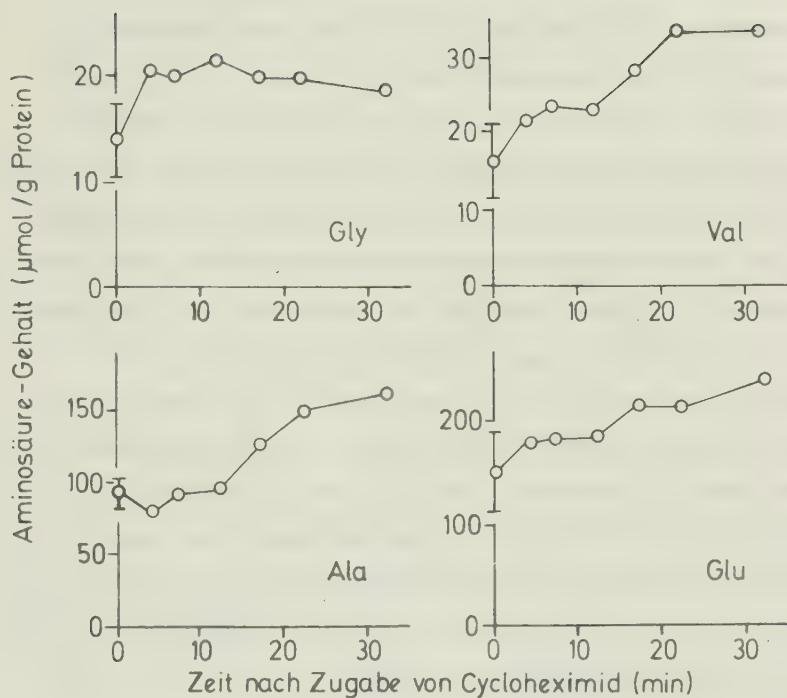


Abb. 8. Zeitverlauf der Größe des intracellulären Pools von zehn verschiedenen Aminosäuren nach Zugabe von Cycloheximid. Der Meßwert zum Zeitpunkt Null entspricht dem Mittelwert von sechs Messungen in Abwesenheit von Cycloheximid. Der Balken entspricht der doppelten Standardabweichung.

3.4. Bestimmung des Protein-Abbaus

Neurospora-Zellen wurden 15 min nach Markierung mit ^{14}C -Leucin mit Cycloheximid inkubiert. Nach 2, 5, 10 und 30 min wurde die Radioaktivität im Gesamtprotein und im freien **Leucin**-Pool bestimmt. Die Radioaktivität im Protein bleibt während dieser Zeit annähernd konstant (Abb. 9 A). Ebenso konnte keine wesentliche Erhöhung der Radioaktivität im Pool gegenüber der Kontrolle ohne Cycloheximid (Zeitpunkt 0 in der Abbildung) beobachtet werden (Abb. 9 B), wie es bei einem Abbau von Proteinen zu erwarten wäre. Somit ist der Umfang an proteolytischen Reaktionen in wachsenden Neurospora-Zellen vernachlässigbar ($< 20\%$ der Neusynthese an Proteinen). Der größte Teil der Proteine wurd also einen vernachlässigbaren Turn-over aufweisen, mit Ausnahme derjenigen Proteine, die in andere Proteine umgebaut werden.

3.5. Kinetik der Markierung der Cytochromoxidase in Abwesenheit von Cycloheximid

In dem hier beschriebenen Versuch wurden die Zellen zunächst mit ^{14}C -Leucin (Grundmarkierung) und nach 200 min mit ^3H -Leucin markiert. Die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse, die in den Proteinen gemessen wurden, entsprechen dann relativen spezifischen ^3H -Radioaktivitäten.

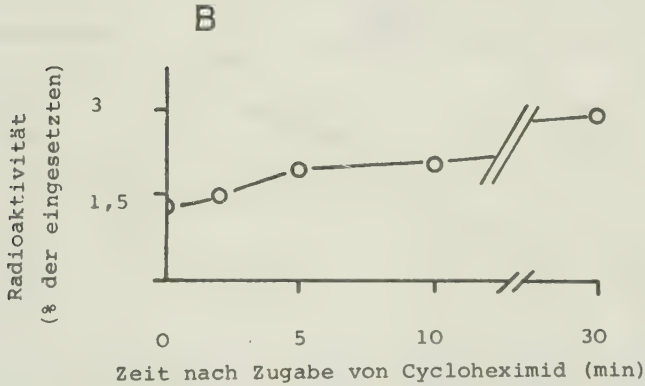
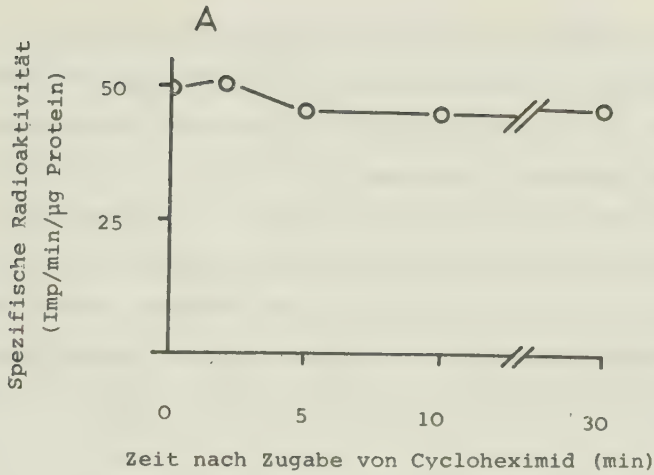


Abb. 9. Stabilität der Markierung der Zellproteine in Gegenwart von Cycloheximid. 15 min nach Pulsmarkierung der Proteine mit 2,5 µCi ^{14}C -Leucin je 50-ml-Kultur wurde der Hemmstoff dem Kulturmedium zugesetzt. A: Zeitverlauf der spezifischen Radioaktivität des Gesamtproteins. B: Zeitverlauf der Radioaktivität im freien intracellulären Leucin-Pool.

Der Zeitverlauf der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse in den mitochondrialen Membranen und in der isolierten Cytochromoxidase ist in Abb. 10 dargestellt. In den mitochondrialen Membranen zeigt das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis einen raschen Anstieg innerhalb der ersten 15 min nach Zugabe des ^3H -Leucins und bleibt dann auf einem konstanten Wert von 3,2. Wenn dieses Verhältnis für Zählausbeuten korrigiert wird (siehe Experimenteller Teil), so erhält man einen Wert von 7,6, der mit dem Verhältnis übereinstimmt,

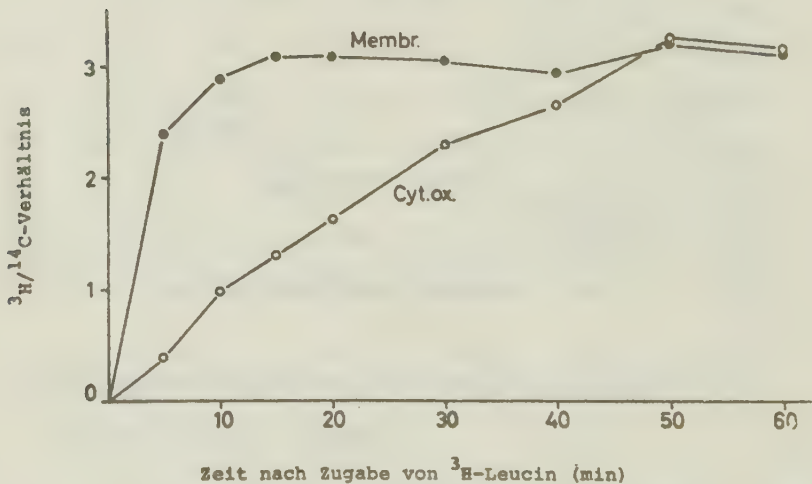


Abb. 10. Zeitverlauf der Markierung des mitochondrialen Membranproteins (●—●) und der Cytochromoxidase (○—○). Die Zellen wurden mit ^{14}C -Leucin (250 μCi je 8-l-Kultur, 250 mCi/mmol) und nach 200 min mit ^3H -Leucin (2 mCi je 8-l-Kultur, 250 mCi/mmol) markiert. Die dargestellten $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse entsprechen relativen spezifischen ^3H -Radioaktivitäten.

in dem die Radioaktivitäten ursprünglich zugesetzt worden waren. Im Gegensatz dazu wird die Cytochromoxidase viel langsamer markiert und erreicht den Wert von 3,2 erst nach 50 min.

Während dieser Zeit nimmt die spezifische ^{14}C -Radioaktivität in der Cytochromoxidase langsam ab (Abb. 11). Durch das Wachstum nimmt die Gesamtmenge an Cytochromoxidase zu und führt zu einer Verdünnung der Markierung. Die Ab-

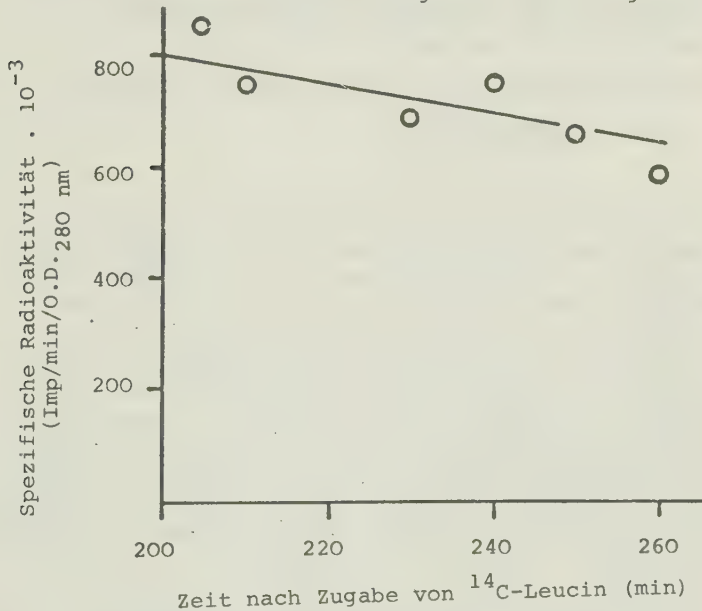


Abb. 11. Zeitverlauf der spezifischen ^{14}C -Radioaktivität der Cytochromoxidase. Die Kreise stellen die experimentellen Daten dar. Die gerade Linie entspricht dem theoretischen Abfall, der auf Grund der Geschwindigkeit des Zellwachstums (Verdopplungszeit 200 min) berechnet wurde.

nahme der spezifischen Radioaktivität, die aus der Verdopplungszeit der Zellen von 200 min errechnet wurde, ist durch die gerade Linie in Abb. 11 dargestellt. Das Zusammenfallen der Meßpunkte mit dieser Linie weist darauf hin, daß ein eventueller Turnover der Cytochromoxidase vernachlässigbar ist.

3.6. Nachweis der Beteiligung verschiedener Vorstufen-Pools bei der Biogenese der Cytochromoxidase

3.6.1. Kinetik des Erscheinens markierter Polypeptide in der Cytochromoxidase

Um den Zeitverlauf des Erscheinens von markierten Polypeptiden in der Cytochromoxidase zu untersuchen, wurden Enzympräparationen von Zellen, die zu acht verschiedenen Zeiten nach Zugabe von ^3H -Leucin geerntet wurden (vgl. Abb. 10), gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Verteilung der Radioaktivität über die Gele ist in Abb. 12 für drei dieser Präparationen dargestellt. In dieser Abbildung sind die ^{14}C -Skalen relativ zu den ^3H -Skalen um den Faktor 3,2 gespreizt, entsprechend dem endgültigen $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der Proteine (vgl. Abschnitt 3.4.).

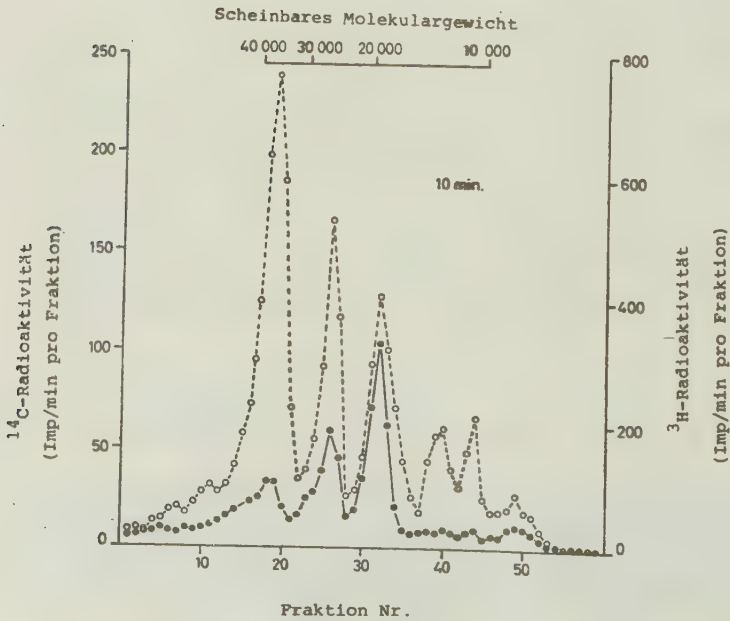
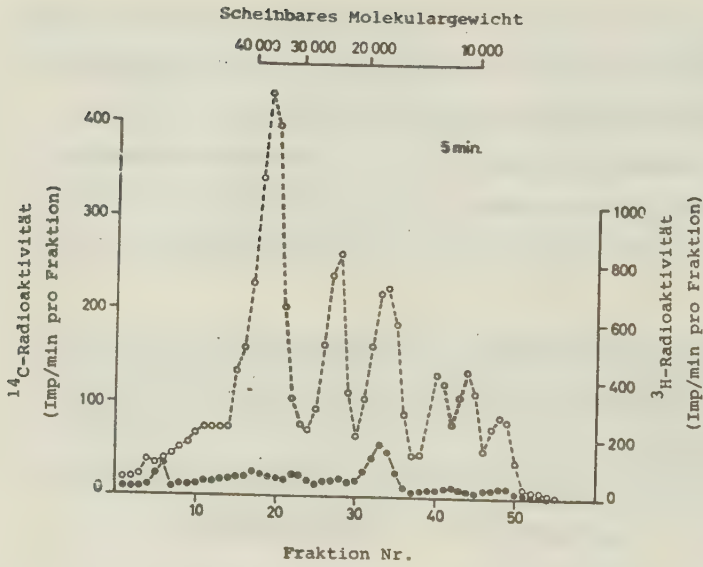
Sechs Radioaktivitätsmaxima können unterschieden werden, die Polypeptiden mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 8 000, 11 000, 13 000, 18 000, 28 000 und 36 000 ent-

sprechen. Das stimmt mit den Ergebnissen von Weiß, 1971, überein, bis auf das Auftreten eines zusätzlichen Polypeptids mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 36 000. Dieses Polypeptid kann nur nachgewiesen werden, wenn die Cytochromoxidase vor der Elektrophorese bei 0° statt bei 37° in Detergenz-Lösung gelöst wird.

Die Verteilungsmuster der ^{14}C -Radioaktivität sind nach verschiedenen Zeiten ähnlich. Damit ist die Möglichkeit ausgeschlossen, daß einzelne Polypeptide der Cytochromoxidase einen Turnover aufweisen, der mit dem Nettozuwachs durch das Zellwachstum vergleichbar ist.

Fünf Minuten nach Zugabe von ^3H -Leucin ist die Radioaktivität hauptsächlich in dem Peak lokalisiert, der einem Molekulargewicht von 18 000 entspricht. In diesem Peak wird das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis von 3,2 nach 20 min annähernd erreicht. Nach 40 min haben vier von den sechs Polypeptiden diesen Wert erreicht, wie sich aus dem Zusammenfallen der ^3H - und der ^{14}C -Radioaktivitätskurven ergibt.

Die unterschiedliche Form der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivitätskurven beim Molekulargewicht 18 000 können durch die Gegenwart eines zusätzlich in kleiner Menge vorkommenden Polypeptids mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 17 000 erklärt werden (Sebald, 1972).



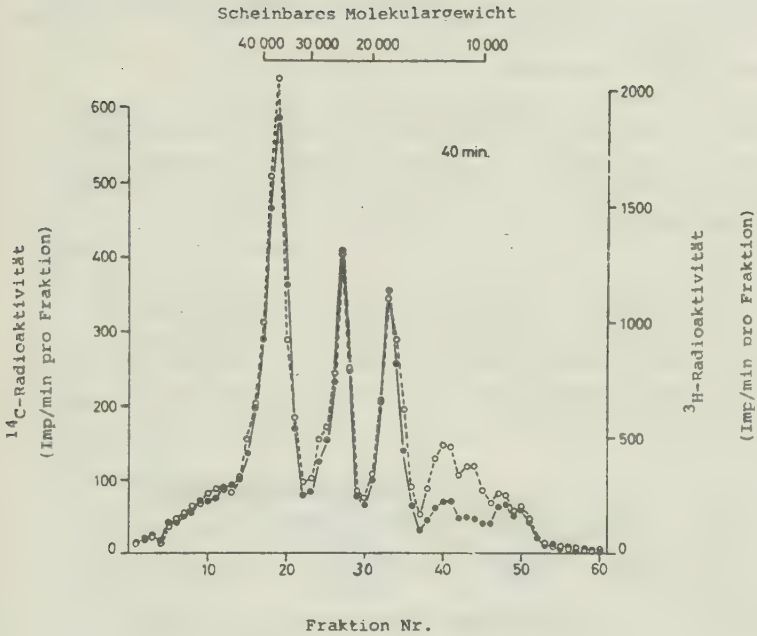


Abb. 12. Verteilung der Radioaktivität über die Gele nach elektrophoretischer Auftrennung von Cytochromoxidase. Drei der in Abb. 10 dargestellten Präparationen sind aufgenommen, die von 5 min, 10 min und 40 min nach Zusatz von ^3H -Leucin geernteten Zellen abgeleitet sind. Die ^{14}C -Skalen sind bezogen auf die ^3H -Skalen um den Faktor 3,2 gespreizt. Die Skalen wurden so gewählt, daß die Flächen unter den ^{14}C -Kurven gleich sind. o--o, ^{14}C -Radioaktivität; ●—●, ^3H -Radioaktivität.

3.6.2. Halbwertszeiten der Vorstufen-Pools der Cytochrom-oxidase

Der Zeitverlauf des Erscheinens von markierten Polypeptiden im Enzymkomplex der Cytochromoxidase ist in Abb. 13 zusammengefaßt.

Man kann annehmen, daß alle Polypeptide einen gemeinsamen Pool von Leucin als Vorstufe haben. Unter den in vorliegendem Experiment gewählten Bedingungen liegt die

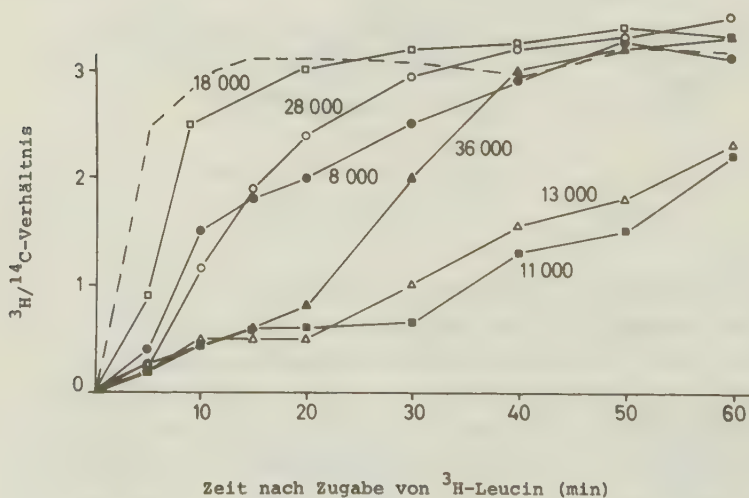


Abb. 13. Zeitverlauf des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses in den einzelnen Polypeptiden der Cytochromoxidase. Markierungsbedingungen siehe Abb. 10. Die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse in den Mitochondrienmembranen wurden zum Vergleich aus Abb. 10 übernommen (----).

Menge an ^3H -Leucin, die der Kultur zugesetzt wurde, in der gleichen Größenordnung wie die Menge an freiem Leucin in den Zellen. Die zugegebene radioaktive Aminosäure wird dann nach 2 - 3 min zur Hälfte ins Protein eingebaut sein. Die Zeit, die zur Synthese der Proteine der mitochondrialen Membran benötigt wird, kann man somit vernachlässigen. Das steht im Einklang mit den hohen Translationsgeschwindigkeiten, die für *Escherichia coli* und für isolierte Reticulocyten berichtet wurden (McQuillen, 1959; Dintzis, 1961; Hunt, 1969). Man kann vernünftigerweise annehmen, daß die Polypeptide der Cytochromoxidase eine ebenso hohe Translationsgeschwindigkeit aufweisen. Die geringere Markierungsgeschwindigkeit der Cytochromoxidase weist folglich darauf hin, daß dieses Enzym aus Pools von Vorstufen-Polypeptiden zusammengesetzt wird.

Die Mengen dieser Vorstufen wurden aus dem Zeitverlauf des Erscheinens markierter Polypeptide in der Cytochromoxidase abgeschätzt. Wenn man annimmt, daß nur eine Vorstufe an der Bildung eines bestimmten Polypeptids der Cytochromoxidase beteiligt ist, wird die Halbwertszeit dieser Vorstufe durch die Zeit gegeben sein, die benötigt wird, bis die Markierung des Endprodukts halbmaximal ist. Bei der Berechnung der Halbwertszeiten, die in Tabelle 2 aufgeführt sind, wurde der Einfluß des Leucin-Pools berücksichtigt, indem von dieser Zeit die Zeit subtrahiert wurde, die für eine halbmaximale Mar-

Tabelle 2. Halbwertszeiten und Größen der Vorstufen-Pools der Polypeptide der Cytochromoxidase. Die Poolgrößen sind in Prozent der Menge des entsprechenden Polypeptids im fertigen Enzym angegeben.

Scheinbares Molekulargewicht	Halbwertszeit der Vorstufe	Poolgröße der Vorstufe
	min	%
8 000	7	4
11 000	47	25
13 000	37	20
18 000	3,5	2
28 000	10	5
36 000	(23) ^a	(10) ^a

^aIm Falle dieses Polypeptids sind zwei oder mehr Vorstufen-Pools hintereinandergeschaltet. Die angegebenen Werte entsprechen der Summe der Halbwertszeiten oder Poolgrößen.

kierung des mitochondrialen Membranproteins benötigt wird. Bei diesen Proteinen kann man den Einfluß von Vorstufen-Polypeptiden vernachlässigen, da zwischen der Markierung des gesamten trichloressigsäureunlöslichen Materials und der der mitochondrialen Membranproteine die Zeitdifferenz sehr klein ist (vgl. Abb. 3, Seite 12).

Die Polypeptide der Molekulargewichte 8 000 und 28 000 zeigen einen ähnlichen Zeitverlauf des Erscheinens der Markierung und könnten deshalb möglicherweise von einem

gemeinsamen Vorstufen-Pool abgeleitet sein. Dasselbe gilt für die Polypeptide der Molekulargewichte 11 000 und 13 000. Auf jeden Fall gibt es mindestens vier unabhängige Pools von Vorstufen-Polypeptiden.

Der sigmoide Zeitverlauf des Erscheinens des markierten Polypeptids mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 36 000 deutet an, daß in diesem Fall mindestens zwei hintereinandergeschaltete Vorstufenpools beteiligt sind.

3.6.3. Poolgrößen der Vorstufen der Cytochromoxidase

Wie schon erwähnt, kann man in den exponentiell wachsenden Zellen, die für dieses Experiment benutzt wurden, keinen Abbau von Proteinen und keinen Turnover der Cytochromoxidase feststellen. Somit ist die Geschwindigkeit des Turnovers einer Vorstufe gleich dem Nettozuwachs des zugehörigen Endprodukts. Die gesamte Zellmasse verdoppelt sich in 200 min, und die Menge an Cytochromoxidase wird sich in der gleichen Zeit verdoppeln. Die Menge einer Vorstufe wird sich zu der des zugehörigen Endprodukts verhalten wie die Halbwertszeit der Vorstufe zu der Verdopplungszeit der ganzen Kultur. Der Einfluß des Nettozuwachses des Vorstufen-Pools kann in dieser Auswertung vernachlässigt werden. Die Poolgrößen sind in Tabelle 2 in Prozent der Menge des zugehörigen Endprodukts angegeben.

4. DISKUSSION

4.1. Anteil des in den Mitochondrien synthetisierten mitochondrialen Membranproteins

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten ist die in Abwesenheit von Cycloheximid erzielte spezifische Radioaktivität in den mitochondrialen Membranen und in den löslichen Proteinen des Cytosols ungefähr gleich der spezifischen Radioaktivität im Gesamtprotein der Zelle. Das ist für eine exponentiell wachsende Kultur, in der alle Teile der Zellen proportional zunehmen, bei Abwesenheit eines Abbaus von Proteinen zu erwarten. Die auf verschiedene Weise ermittelten Geschwindigkeiten des Leucin-Einbaus in Abwesenheit von Cycloheximid (Tabelle 1) stimmen jedoch nur größenordnungsmäßig überein; im Falle der Markierung mit niedriger Leucinkonzentration werden für alle Fraktionen verhältnismäßig hohe Einbauwerte erhalten. Bei der Berechnung dieser Werte wurde vorausgesetzt, daß der Leucin-Pool sowohl intracellulär als auch intercellulär gleichmäßig markiert wird. Das ist jedoch unter den angewandten experimentellen Bedingungen nicht gewährleistet. Ein großer Teil der Zellen liegt als Flocken mit einem Durchmesser von ca. 0,1 mm vor. Es ist wahrscheinlich, daß die Zellen in der Mitte der Flocken eine geringere Stoffwechselaktivität aufweisen als die am Rand der Flocken. Der Leucinpool dieser

weniger aktiven Zellen wird wahrscheinlich weniger stark markiert, da diese Zellen die Aminosäure langsamer aus dem Medium aufnehmen werden. Gleichzeitig wird in diesen Zellen auch die Proteinsynthese langsamer verlaufen. Der größte Teil der Proteine wird demnach in Zellen synthetisiert werden, deren freies intracelluläres Leucin eine höhere spezifische Radioaktivität aufweist als das des Durchschnitts der Zellen. Die berechnete Leucin-Einbaugeschwindigkeit wird also im Durchschnitt zu hoch sein.

Bei ähnlichen Kulturen von *Aspergillus niger* lassen autoradiographische Untersuchungen ebenfalls auf eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität der einzelnen Zellen schließen (Liebs, 1968). Eine gleichmäßige Markierung aller Zellen kann nur erreicht werden, wenn die Ausbildung von Mikrokolonien verhindert wird (Shinmyo, 1970). Eine Diskrepanz zwischen statischem (durch Extraktion bestimmtem) und dynamischem (aus kinetischen Untersuchungen errechnetem) Aminosäurepool ist auch bei wachsenden Oberflächenkulturen von *Neurospora crassa* beobachtet worden (Zalokar, 1961). Obwohl der Autor als Interpretation eine intracelluläre Inhomogenität des Pools vorschlägt, ist in diesem Fall eine unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Zellen auf der der Oberfläche der Kultur zugewandten Seite und der Zellen auf der der Oberfläche abgewandten Seite der Kultur ebenfalls wahrscheinlich.

Wendet man hingegen zur Markierung Leucin in einem hohen Überschuß gegenüber dem freien intracellulären Leucin an, so kann man annehmen, daß sowohl der cytoplasmatische als auch der mitochondriale Leucin-Pool aller Zellen die spezifische Radioaktivität des eingesetzten Leucins erreicht. Die berechnete Leucin-Einbaugeschwindigkeit wird dann sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Cycloheximid der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Neusynthese von Proteinen entsprechen. Im Fall ohne Cycloheximid wird auf diese Weise ein Wert erhalten, der mit dem auf Grund der Wachstumsgeschwindigkeit ermittelten gut übereinstimmt.

Der mit Cycloheximid nicht hemmbare Anteil des Aminosäure-Einbaus in die Mitochondrienmembranen entspricht dem mitochondrialen Anteil an der Synthese der mitochondrialen Membranproteine. Da in den hier beschriebenen Versuchen die gesamte in Gegenwart von Cycloheximid in Polypeptidketten eingebaute Radioaktivität erfaßt wird, einschließlich der in Vorstufen-Polypeptiden eingebauten, wird das Ergebnis nicht dadurch verfälscht, daß die Markierung von komplexen Membranproteinen verzögert oder durch die Wirkung von Cycloheximid verhindert wird, vorausgesetzt, daß der Inhibitor die Geschwindigkeit der mitochondrialen Proteinsynthese nicht beeinflußt.

Die mitochondriale Proteinsynthese läuft nach Hemmung der cytoplasmatischen Ribosomen über mindestens 20 min mit annähernd konstanter Geschwindigkeit weiter, wobei Polypeptidketten von hohem Molekulargewicht entstehen (Sebald, 1969). Im Falle der Cytochromoxidase wird ein Teil davon in ein aktives Enzymprotein integriert. Bei längerer Einwirkung des Inhibitors hört zwar der Aminosäureeinbau allmählich auf, das mitochondriale System wird jedoch nicht irreversibel geschädigt, da aus längere Zeit mit Cycloheximid vorbehandelten Zellen isolierte Mitochondrien noch radioaktive Aminosäuren inkorporieren (Sebald, 1969). Diese Befunde sprechen dafür, daß das mitochondriale System selbständig ohne die Mitwirkung des cytoplasmatischen arbeiten kann, so daß es in seiner Geschwindigkeit durch die Gegenwart von Cycloheximid zumindest während der ersten Zeit nicht beeinflußt werden dürfte.

Demnach liefern die mitochondrialen Ribosomen ca. 11 % des in der Zeiteinheit synthetisierten mitochondrialen Membranproteins. Unter den Bedingungen exponentiellen Wachstums folgt daraus, daß ca. 11 % des mitochondrialen Membranproteins innerhalb der Organellen synthetisiert wird.

Dieses Ergebnis liegt in der gleichen Größenordnung wie das anderer Autoren. Hawley (1970) fand, daß 2 % des Ein-

baus von radioaktivem Leucin in das Gesamtprotein von *Neurospora crassa* gegen Cycloheximid resistent ist. Dazu wurden die Zellen mit ^{14}C -Leucin in Konzentrationen von 20 μM bis 200 μM markiert, so daß die Proteinsynthesegeschwindigkeit aus dem Einbau des radioaktiven Leucins direkt ermittelt werden kann. Da das Protein der mitochondrialen Membranen etwa 1/7 des Gesamtproteins darstellt, folgt daraus, daß 13 % dieses Proteins an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird. In der gleichen Arbeit ist ein weiteres Experiment beschrieben, wonach der Cycloheximid-resistente Einbau von radioaktivem Leucin in ganze Mitochondrien 14,5 % der Kontrolle ohne Cycloheximid beträgt. Bei diesem Versuch wurde ^{14}C -Leucin in einer Konzentration von 2 μM verwendet. Nach dem in dieser Arbeit gesagten kann man in diesem Fall aus dem Anteil der Cycloheximid-resistenten Markierung nicht direkt auf den Anteil des an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten Proteins schließen.

Schweyen und Kaudewitz (1970) fanden bei *Saccharomyces cerevisiae* einen Anteil des an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten mitochondrialen Membranproteins von 15 %. Diese Autoren benutzten eine Leucin-auxotrophen Stamm, um die Leucin-Biosynthese auszuschalten.

4.2. Mechanismus der Biosynthese der Cytochromoxidase

Mit Hilfe eines Pulsmarkierungsexperiments in Abwesenheit von Cycloheximid konnte gezeigt werden, daß in der Biogenese der Cytochromoxidase mindestens vier unabhängige Pools von Vorstufen-Polypeptiden auftreten. Aus früheren Ergebnissen folgt, daß diese Vorstufen in zwei verschiedenen Kompartimenten, Mitochondrien und Cytosol, synthetisiert werden.

Wegen der Komplexität dieses Enzymproteins ist es wahrscheinlich, daß sein Aufbau in mehreren Stufen erfolgt. Die Vorstufen können deshalb neben einfachen Polypeptiden auch aus mehreren Polypeptiden zusammengesetzte Moleküle oder modifizierte Formen darstellen. Diese Betrachtungsweise würde einschließen, daß mehrere hintereinandergeschaltete Vorstufen-Pools bei der Bildung einer Unter-einheit beteiligt sein können. Wenn diese Pools von vergleichbarer Größe sind, wird es zu einem sigmoiden Zeitverlauf des Erscheinens markierter Polypeptide kommen, wie es für das Polypeptid mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 36 000 gefunden wurde. Dagegen würden hintereinandergeschaltete Pools von sehr unterschiedlicher Größe durch die angewandten experimentellen Methoden nicht nachgewiesen werden können.

Auf jeden Fall kann man aus experimentellen Daten, die nur das Endprodukt betreffen, keine Schlüsse auf die Reihenfolge des Zusammenbaus ziehen.

Wie früher gezeigt (Weiß, 197), ist das Polypeptid der Cytochromoxidase mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 18 000 mitochondrialen Ursprungs. Der niedrige Vorstufen-Pool dieses Polypeptids stünde im Einklang mit einem direkten Transfer einer neusynthetisierten Peptidkette in die mitochondrialen Membranen aus dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Zusammenbaus der Cytochromoxidase. Wenn man annimmt, daß dieses Polypeptid in der Cytochromoxidase einmal je Hämgruppe vorkommt, wird die absolute Poolgröße für die Vorstufe dieses Polypeptides, ausgehend von einem Cytochrom-aa₃-Gehalt von 0,24 µmol/g mitochondriales Protein (Weiß, 1969), sich zu 0,01 µmol/g mitochondriales Protein errechnen. Das ist in der gleichen Größenordnung wie der Ribosomengehalt der Mitochondrien (0,02 µmol/g mitochondriales Protein).

Während der mitochondriale Ursprung dieses Polypeptides auf Grund der Cycloheximid-resistenten Markierung überaus wahrscheinlich ist, kann man aus der Beobachtung, daß die anderen Polypeptide unter diesen Versuchsbedingungen nicht markiert werden, (Weiß, 1971), nicht ohne weiteres schließen, daß sie cytoplasmatischen Ursprungs

sind. Da diese Polypeptide verhältnismäßig große Pools von Vorstufen durchlaufen, ist es möglich, daß die Vorstufen zwar an den mitochondrialen Ribosomen gebildet werden, daß aber der Zusammenbau des Enzymproteins in Gegenwart des Inhibitors zum Stillstand kommt, ehe die markierten Polypeptide in merklichem Maße in das Protein integriert werden. So sind die größeren zwei Polypeptide wahrscheinlich mitochondrialen Ursprungs (Sebald, 1972),

Im Gegensatz zu Cycloheximid kann Chloramphenicol, ein Inhibitor der mitochondrialen Proteinsynthese, den Zusammenbau des Cytochromoxidase-Komplexes völlig unterbinden, vermutlich, weil der kleine Vorstufen-Pool des Polypeptids mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 18 000 schnell verbraucht wird. Nach Auswaschen des Inhibitors erscheinen aber die drei kleineren Polypeptide im Enzymprotein markiert, obwohl zu diesem Zeitpunkt das freie intracelluläre Leucin nicht mehr markiert ist. Diese drei Polypeptide sind also cytoplasmatischen Ursprungs, werden aber in Gegenwart von Chloramphenicol nicht in das Enzymprotein integriert.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Anzucht und Markierung der Mycelien

Konidien von *Neurospora crassa* wurden in Vogel's Minimalmedium (Vogel, 1956) inokuliert (2×10^6 Konidien pro ml) und die Suspension unter heftiger Durchströmung mit steriler Luft bei 25° inkubiert. Für Experimente ohne Isolierung von Cytochromoxidase wurde eine 2-l-Kultur (ca. 1.6 g Protein) nach 17stündigem Wachstum (exponentielle Phase) in 50-ml-Portionen geteilt, die eine weitere Stunde bei 25° geschüttelt wurden.

Die einzelnen Portionen wurden dann durch Zusatz von $[G-^3H]L$ -Leucin und $[U-^{14}C]L$ -Leucin markiert. Gegebenenfalls wurde die spezifische Radioaktivität des verwendeten Leucins vorher durch Zusatz von nichtradioaktivem Leucin herabgesetzt. Die genauen Markierungsbedingungen sind in den Legenden der betreffenden Abbildungen angegeben. Cycloheximid wurde in einer Konzentration von 0,1 g/l eingesetzt. Die Markierung mit und ohne Cycloheximid erfolgte parallel mit Hyphen aus der selben Anzucht. Die markierten Hyphen wurden über ein Kunstfasertuch auf einem Büchner-Trichter abfiltriert und durch Pressen zwischen zwei mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumblöcken eingefroren (Gefrierstop).

Zur Isolierung von markierter Cytochromoxidase wurde eine 8-1-Kultur (ca. 6 g Protein) nach 17stündigem Wachstum als ganzes markiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (siehe Ergebnisse) wurden Proben von 1 - 1,5 l entnommen und wie oben gefriergestoppt.

5.2. Bestimmung der Radioaktivität im Aminosäurepool und im Gesamtprotein

Die gefrorenen Zellen (s. o.) wurden in einem Mörser in Gegenwart von flüssigem Stickstoff gepulvert. Das gefrorene Zellpulver (0,3 g) wurde mit 2 ml Trichloressigsäure (8 % in 50 % Äthanol) vermischt und der entstandene Brei auf 5° erwärmt und zentrifugiert. Das Sediment wurde noch dreimal mit Trichloressigsäure (6 % in Wasser) und einmal mit Aceton extrahiert und durch Ultraschallbehandlung in Ameisensäure gelöst. In dieser Lösung wurde die Radioaktivität gemessen und nach Entfernung der Ameisensäure im Vakuum der Proteingehalt nach Lowry bestimmt.

Zur Isolierung der freien intracellulären Aminosäuren wurden die ersten beiden Trichloressigsäure-Extrakte vereinigt. Die folgenden Schritte erfolgten bei Zimmertemperatur: Nach Entfernung des Äthanol und der Hauptmenge der Trichloressigsäure im Vakuum über KOH wurde die verbleibende Lösung auf eine Kationenaustauscher-Säule (Dowex WX-2, 200 - 400 mesh, 0,3 × 2 cm) aufgetragen. Die Säule

wurde zweimal mit 2 ml 0,5 N Essigsäure und einmal mit 3 ml Wasser gewaschen, und die Aminosäuren gemeinsam in 1 ml Triäthylamin (2 N in 20 % Aceton) eluiert (Harris, 1961). In dieser Aminosäure-Mischung wurde die Radioaktivität bestimmt und der Gehalt an den einzelnen Aminosäuren durch Ionenaustauscher-Chromatographie bestimmt. Es konnte durch Dünnschichtchromatographie sichergestellt werden, daß die Radioaktivität ausschließlich im Leucin auftrat.

5.3. Ermittlung der Verwertbarkeit von Aminosäuren als alleinige Kohlenstoffquelle

Vogel's Minimalmedium ohne Saccharose wurde mit 2 % (im Falle von Leucin auch 0,2 %) der betreffenden Aminosäure versetzt und der pH-Wert mit NaOH oder Essigsäure auf 5 - 6 eingestellt. 5 ml dieses Mediums wurden mit Konidien wie üblich inokuliert und bei 25° geschüttelt.

5.4. Dünnschichtchromatographie der intracellulären Aminosäuren

Der Trichloressigsäure-Extrakt bzw. das gereinigte Aminosäure-Gemisch wurde auf eine Kieselgelplatte (Fertigplatte der Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Platte wurde mit Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak (2 : 2 : 1, v/v/v) entwickelt. Die Verteilung der ¹⁴C-Radioaktivität wurde

mit einem Dünnschicht-Scanner der Fa. Berthold ermittelt. Als Vergleichssubstanz diente ^{14}C -Leucin.

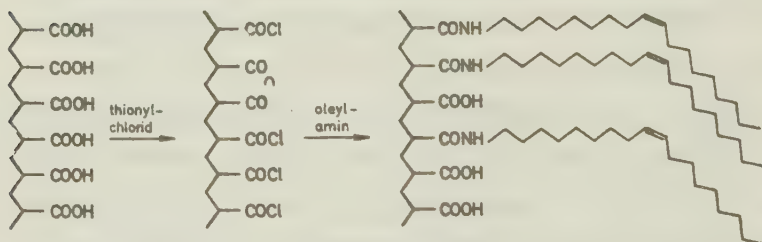
5.5. Isolierung von mitochondrialen Membranen und von löslichen Proteinen des Cytosols

Alle Schritte erfolgten bei ca. 5° . Die eingefrorenen Zellen wurden in 10 ml Isolationsmedium (0,44 M Saccharose, 5 mM Tris- SO_4 (Tris-hydroxymethyl-aminomethan, mit Schwefelsäure teilweise neutralisiert), pH 7,6, 1 mM Äthylen-dinitrilo-tetraessigsäure) pro g Feuchtgewicht mit einem Ultraturrax oder bei größeren Ansätzen mit einem Mixer fein verteilt und anschließend in einer Kormühle (Weiß, 1969) homogenisiert. Das Homogenat wurde zweimal 5 min bei $3\,000 \times g$ zentrifugiert, wobei das Sediment jeweils verworfen wurde. Durch halbstündiges Zentrifugieren bei $12\,000 \times g$ wurden die Mitochondrien isoliert und noch einmal durch Zentrifugation (einmal 5 min bei $3\,000 \times g$, Überstand einmal 30 min bei $12\,000 \times g$) gewaschen. Das Sediment wurde nun in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,6 mit Ultraschall behandelt (ca. 5 mg Protein/ml, Probenvolumen ca. 0,2 ml - 10 ml, 4 bis 6mal Stufe 3 - 8, Branson Sonifier Modell S 75) und anschließend 30 min bei $12\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde 60 min bei $100\,000 \times g$ zentrifugiert und die sedimentierten mitochondrialen Membranen durch Ultraschallbehandlung in Phosphat-Puffer wie oben resuspendiert.

Der Überstand der ersten Zentrifugation bei $12\,000 \times g$ wurde nochmals 60 min bei $100\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde 72 h bei 5° gegen 20 mM DL-Leucin dialysiert. Die entstandene Lösung enthielt die löslichen Proteine des Cytosols.

5.6. Isolierung der Cytochromoxidase

Oleyl-polypethacrylsäure-Harz wurde entsprechend dem folgenden Formelschema synthetisiert (Weiß, 1970a und 1971):



(Als Ausgangssubstanz diete käufliche Polymethacrylsäure.)

Das fertige Harz wurde zunächst durch eine äquivalente Menge 1 M Tris in die Tris-Form überführt und in eine Säule gefüllt ($0,6 \times 8$ cm), die mit 0,1 M Trisacetat, pH 6,2, äquilibriert wurde (Temperatur der Säule 2°). Die in Phosphatpuffer resuspendierten mitochondrialen Membranen wurden mit 10 mg Desoxycholat je mg Protein teilweise solubilisiert und auf die Säule aufgetragen. Danach wurde ein Gradient von steigender und anschließend fallender

Tris-Konzentration durch die Säule geleitet. Dieser Gradient wurde durch Hintereinanderschalten von drei Gefäßen erzeugt, die je 7,5 ml 0,1 M, 1 M und 0,01 M Tris-Acetat-Pufferlösung pH 8,0 enthielten, wobei die Entnahme aus dem Gefäß mit 0,1 M Tris-Acetat erfolgte. Anschließend wurden mit der gleichen Geschwindigkeit folgende Lösungen (alle pH 8,0) durch die Säule geleitet:

1. 0,01 M Tris-Acetat bis zum Erreichen eines pH von 8 am Säulenausgang (ca. 2 h);
2. 0,01 M Tris-Acetat, 0,5 % K-Cholat, 0,5 % K-Desoxycholat, 2h;
3. 0,2 M Tris-Acetat, 0,5 % K-Cholat, 0,5 % K-Desoxycholat, 2 h;
4. 0,2 M Tris-Acetat, 0,5 % K-Cholat, 0,5 % K-Desoxycholat, 2 M KCl, 8 h;
5. 0,2 M Tris-Acetat, 1 % K-Cholat, 0,5 % K-Desoxycholat, 3 M KCl, 3 h;
6. 0,2 M Tris-Acetat, 3 M KCl, bis zu einem deutlichen Abfall der Extinktion bei 280 nm im Eluat (ca. 2 h).

Die Cytochromoxidase wurde mit folgender Lösung eluiert:

0,2 M Tris-Acetat, 3 M KCl, 0,5 % Tween 80, pH 8,0.

Die schwach grünen cytochromoxidasehaltigen Fraktionen wurden vereinigt, 8 h gegen eiskaltes Wasser dialysiert und auf eine Säule (0,6 × 0,6 cm) aus DEAE-Cellulose auf-

getragen, die mit 0,05 M Tris-Acetat, pH 7,5, äquili-
briert war. Die Säule wurde mit 20 ml der gleichen Lö-
sung gewaschen (40 ml/h). Die Cytochromoxidase wurde mit
0,1 M Tris-Acetat, 0,3 M KCl eluiert (10 ml/h). Die
grünen cytochromoxidasehaltigen Fraktionen (ca. 0,2 ml)
wurden vereinigt und nach spektroskopischer Untersuchung
8 h gegen eiskaltes Wasser dialysiert.

Typische Spektren sind in Abb. 14 wiedergegeben. Die
Reinheit der Cytochromoxidase wurde aus dem Verhältnis

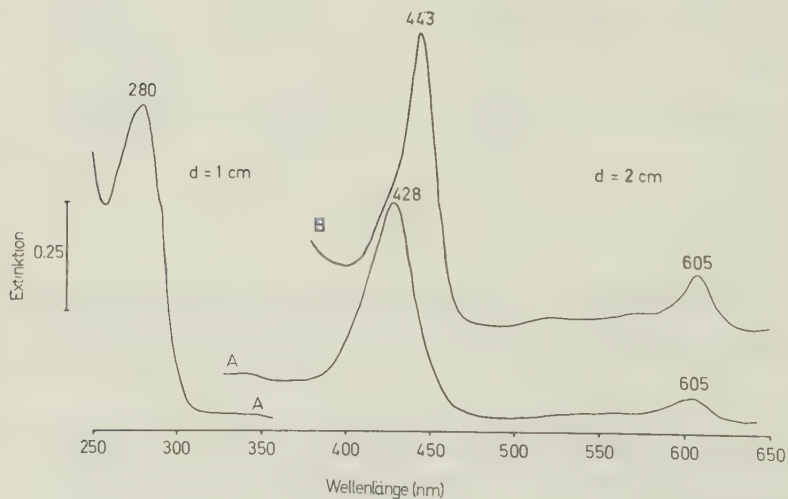


Abb. 14. Absolutspektren der gereinigten Cytochromoxidase.
A: oxydierte Form; B: 10 min nach Zugabe von Dithionit.

der Extinktion der oxydierten Form bei 280 nm (Protein) zu der bei 428 nm (Häm a) ermittelt. Dieses Verhältnis hatte einen Wert von 3 - 4. Dieser Reinheitsgrad entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (Weiß, 1971; Yonetani, 1961).

5.7. Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese

Die lyophilisierte Cytochromoxidase wurde in 5 % Natrium-dodecylsulfat, 5 % Mercaptoäthanol, 0,1 M Tris-Cl, pH 8,0 (1 mg Protein/ml) durch zweistündige Inkubation bei 0° gelöst. Die Polyacrylamid-Gele (15 % Polyacrylamid) wurden ausgehend von zwei Stammlösungen hergestellt: a) 12 g Acrylamid, 0,1 ml N,N'-Tetramethyl-äthylendiamin, 320 mg Bisacrylamid, Wasser auf 60 ml; b) 0,1 g Ammonium-peroxodisulfat, Wasser auf 20 ml. Die beiden Lösungen wurden in der Kälte gemischt. Die Polymerisation erfolgte bei Zimmertemperatur in senkrechtstehenden zerlegbaren Formen (2 × 75 × 150 mm). Die Formen enthielten Einstülpungen, die in den fertigen Gelen am Startpunkt der Elektrophorese Schlitze quer zur Laufrichtung zum Auftragen der Proben ergaben (Volumen je 20 µl). Die Gele wurden anschließend mindestens zwei Tage mit 0,5 % Natrium-dodecylsulfat, 0,05 M Mercaptoäthanol, 0,1 M Tris-Cl, pH 8,0 äquilibriert und in der gleichen Lösung gelagert. Vor der Elektrophorese wurde ein Gelstreifen vorsichtig mit Filterpapier von der äußerlich anhaftenden Flüssigkeit be-

freit und auf eine Glasplatte gelegt. Nach auftragen der Cytochromoxidase-Lösung wurde das Gel durch dicke Filterpapierstreifen mit dem Elektrodenpuffer (0,5 % Natriumdodecylsulfat, 0,1 M Tris-Cl, pH 8,0) in elektrischen Kontakt gebracht. Während der Elektrophorese (50 mA/Gelstreifen) wurde das Gel von beiden Seiten gekühlt. Der Stromdurchfluß wurde unterbrochen, sobald eine in einem weiteren Schlitz parallel augetragene Probe vom Cytochrom c genau 6 cm gewandert war.

Die einzelnen Bahnen wurden in Querstreifen von 1 mm Dicke geschnitten. Jeder Streifen wurde mit 0,5 ml 0,5 % Natriumdodecylsulfat, 0,1 M Tris-Cl, pH 8,0 in einem Zählgläschen 24 h bei 60° geschüttelt. Nach Auffüllen mit Scintillationsflüssigkeit (s. u.) wurde die Radioaktivität bestimmt.

5.8. Radioaktivitätsmessungen

Die Messung von Radioaktivitäten erfolgte in einem Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer vom Typ TriCarb der Fa. Packard Instruments. Als Scintillationsflüssigkeit diente eine Lösung von 6 g Butyl-PBD (2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol) in 600 ml Toluol und 400 ml Methylglykol (2-Methoxyäthanol). Zur Messung der Radioaktivität von Leucin und von wasserlöslichen Proteinen sowie von dem in konzentrierter Ameisensäure gelös-

ten Gesamtprotein wurden 0,5 ml der betreffenden Lösung in einem Zählgläschen mit 15 ml Scintillationsflüssigkeit gemischt. Mitochondriale Membranen wurden zuvor mit 2 % Natrium-dodecylsulfat, 0,1 M Tris-Cl. pH 8,0 solubilisiert. Die Zählkreisbeuten betrugen in allen Fällen 61 % für ^{14}C und 27 % für ^3H .

Der Proteingehalt wurde jeweils in einem Aliquot nach Lowry bestimmt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einbau von radioaktivem Leucin in vivo in die Proteine wachsender Zellen von *Neurospora crassa* wurde untersucht. Bei niedrigen Leucin-Konzentrationen im Medium, entsprechend $0,19 \mu\text{mol/g}$ Zellprotein, wird der größte Teil der Radioaktivität rasch in den intracellulären Leucin-Pool aufgenommen und innerhalb weniger Minuten in die Proteine der Zellen eingebaut.

Es ergibt sich eine Pulsmarkierung der Proteine. Die erzielten spezifischen Radioaktivitäten sind für das mitochondriale Membranprotein und für die löslichen Proteine des Cytosols etwa gleich der für das Gesamtprotein. Erhöht man die Konzentration des Leucins im Medium auf einen Wert entsprechend $15 \mu\text{mol/g}$ Zellprotein, so erhält man einen linearen Zeitverlauf der Markierung der Proteine. Ein Abbau von Leucin oder von Proteinen konnte nicht beobachtet werden.

In Gegenwart von Cycloheximid wird der Einbau des radioaktiven Leucins in die Proteine gehemmt. Die Hemmung ist im Fall der mitochondrialen Membranproteine am geringsten. Der Cycloheximid-resistente Anteil des Einbaus von Leucin in diese Proteine, der dem Anteil des an den mitochondrialen Ribosomen synthetisierten mitochondrialen Membranproteins entspricht, konnte zu 11 % abgeschätzt werden.

Nach Pulsmarkierung in vivo ist die Markierung der Cytochromoxidase gegenüber der des gesamten mitochondrialen Membranproteins verzögert. Aus der unterschiedlichen Verzögerung des Erscheinens der Radioaktivität in den einzelnen Polypeptiden konnte geschlossen werden, daß bei der Biogenese der Cytochromoxidase mindestens vier unabhängige Pools an Vorstufen-Polypeptiden beteiligt sind. Den kleinsten Pool weist mit 2 % der Menge des entsprechenden Polypeptids im fertigen Enzymprotein ein Polypeptid auf, das an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird. Der größte Pool beträgt 25 % der Menge des entsprechenden Polypeptids in der fertigen Cytochromoxidase. Im Falle eines Polypeptids wird ein sigmoider Zeitverlauf des Erscheinens der Radioaktivität beobachtet, was auf mindestens zwei hintereinandergeschaltete Vorstufen-Pools hinweist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- M. Ashwell und T. S. Work (1970), Ann. Rev. Biochem. 39,
251
- D. S. Beattie, R. E. Basford und S. B. Koritz (1967),
Biochemistry 6, 3099
- D. S. Beattie (1971), Sub-Cell. Biochemistry 1, 1
- P. Borst (1972), Ann. Rev. Biochem. 41, 333
- H. M. Dintzis (1961), Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.
47, 247
- C. K. Harris, E. Tigane und C. S. Hanes (1961), Can.
J. Biochem. Physiol. 39, 439
- E. S. Hawley und J. W. Greenawalt (1970), J. Biol. Chem.
245, 3574
- T. Hunt, T. Hunter und A. Munro (1969), J. Mol. Biol.
43, 123
- P. Liebs (1968), Archiv für Mikrobiol. 61, 103
- K. Mcquillen, R. B. Roberts und R. J. Britten (1959),
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 45, 1437
- W. Neupert, D. Brdiczka und Th. Bücher (1967), Biochem.
Biophys. Res. Commun. 27, 488

- W. Neupert und G. D. Ludwig (1970), Europ. J. Biochem.
19, 523
- M. L. Pall (1969), Biochim. Biophys. Acta 173, 113
- R. Schweyen und F. Kaudewitz (1970), Biochem. Biophys.
Res. Commun. 38, 728
- W. Sebald, A. J. Schwab und Th. Bücher (1969), FEBS Lett.
4, 243
- W. Sebald, G. Jackl und H. Weiß (1972), Europ. J. Biochem.
30, 413
- A. Shinmyo und G. Terui (1970), J. Ferment. Technol. 48, 146
- A. Tzagaloff und P. Meagher (1972), J. Biol. Chem. 247, 594
- H. J. Vogel (1956), Microbial Genet. Bull. 13, 42
- R. E. Webster und S. R. Gross (1965), Biochemistry 4, 2309
- H. Weiß, G. v. Jagow, M. Klingenberg und Th. Bücher (1970),
Europ. J. Biochem. 14, 75
- H. Weiß und Th. Bücher (1970a), Europ. J. Biochem. 17, 561
- H. Weiß, W. Sebald und Th. Bücher (1971), Europ. J. Biochem.
22, 19
- H. Weiß (1972), Europ. J. Biochem. 30, 469
- T. Yonetani (1961), J. Biol Chem. 236, 1680
- M. Zalokar (1961), Biochim, Biophys. Acta 46, 423

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher
danke ich für die großzügige Förderung
dieser Arbeit

LEBENS LAUF

Am 11. Juni 1943 wurde ich als Sohn des Chemikers Georg-Maria Schwab und der Physikerin Elly Schwab, geb. Agallidis, in Athen geboren. Ich besuchte von 1948 bis 1950 die Volksschule in Athen und von 1950 bis 1952 die Volksschule an der Schwanthalerstraße in München. 1952 trat ich in die Klenze-Oberrealschule in München ein, wo ich im Juli 1961 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1961/62 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München, das ich am 2. April 1969 mit dem Diplom abschloß. Seit August 1969 arbeite ich am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Theodor Bücher an meiner Doktorarbeit.

